

寒天ゲル内免疫拡散法に用いる牛白血病ウイルス抗原の最適力価について

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	小山, 弘之
巻/号	34巻8号
掲載ページ	p. 374-378
発行年月	1981年8月

寒天ゲル内免疫拡散法に用いる牛白血病ウイルス抗原の最適力価について

小山弘之* 宝達 勉** 梶川 治* 椿 志郎* 吉川博康* 吉川 堯* 斉藤 博*

(昭和 56 年 1 月 16 日受理)

Optimal Titer of Bovine Leukemia Virus Antigen for Immunodiffusion Test
HIROYUKI KOYAMA (School of Veterinary Medicine and Animal Science,
Kitasato University, Towada, Aomori 034) et al.

SUMMARY

For the agar gel immunodiffusion test, bovine leukemia virus antigen was prepared from persistently infected cell culture fluid. It contained envelope glycoprotein (gp) antigen and core protein (p) antigen, the latter being twice as much as the former. An antibody survey was conducted on 453 cattle in the field.

In the test, the central well was filled with antigen, two surrounding wells were with positive control serum, and the other four with serum to be tested. As a result, when gp antigen was used after adjusting its titer to 4 units, the best results were obtained and both gp and p antibody could be detected. Both antibodies were very low in titer in the positive serum. Cattle positive for p antibody were only 19.7 % of those positive for gp antibody.

要 約

寒天ゲル内免疫拡散法によって野外牛の牛白血病ウイルス抗体を検出するために用いる抗原の最適力価について検討を行なった。

抗原は牛白血病ウイルス持続感染細胞培養液を出発材料とし、ウイルス不活化後、150 倍濃縮して調整した。この抗原はエンベロープ糖蛋白抗原 (gp 抗原) とコア-蛋白抗原 (P 抗原) の両方を含有し、P 抗原が gp 抗原の 2 倍量多く含まれている。抗原はボックス力価測定法により決定し、異なる抗原力価を用いて野外牛 453 頭につき抗体検出を行なった。この試験においては中央の穴へ抗原を、周囲 6 穴のうち 2 穴に陽性対照血清を、残り 4 穴に被検血清を入れて反応させた。この結果、gp 抗原力価を 4 単位に調整することにより最も良好な成績が得られ、gp 抗原に対する抗体 (gp 抗体) と、P 抗原に対する抗体 (P 抗体) の両方の検出が可能であった。つぎに陽性血清について抗体価を測定した結果、両抗体は極めて低値を示した。また、P 抗体陽性牛は gp 抗体陽性牛のわずか 19.7% であった。

成牛型牛白血病および持続性リンパ球増多症は感染症であり、その原因として牛白血病ウイルス (以下 BLV と略す) が外因性因子と目されている^{1,2,4,13,15}。BLV 感染を受けた個体は抗体を産生し、この抗体を検出することは感染を知るうえに有効な手段として用いられている。その方法は寒天ゲル内免疫拡散法 (以下 AGID と略す)^{9,10,14}、免疫蛍光法^{2,4,12}、補体結合反応^{2,10,12}、ラジオイムノアッセイ^{2,10,12}、Syncytium 阻止試験^{2,6}、等が報告されている。このうち AGID は操作が簡単で、しかもラジオイムノアッセイを除く他の方法と比べ感度が良好である点から、最も広く利用されている^{2,12}。しかし、AGID に用いるべき最適な抗原力価についての報告はみられない。そこでわれわれは AGID を行なうに

あたり、まず抗原力価の検討を行なったのでその成績を報告する。

1. 材 料 お よ び 方 法

1) ウ イ ル ス

VAN DER MAATEN らが確立した BLV 持続感染細胞 (FLK/BLV) を用いた¹⁰。この株は継代歴 180 代で北海道大学、小沼博士より分与され、以後当教室で維持し、実験には 20 代以内で用いた。培養は MEM 培養液に 5% 牛胎児血清と抗生物質を添加し、37°C で 5~7 日ごとに継代した培養液をウイルス抗原とした。

2) ウ イ ル ス 感 染 価 の 測 定

ウイルス感染価はコウモリ肺株化細胞 (Tb₁Lu) を用いたが、細胞は FERRER らに準じ DEAE 処理後、ウイルス接種し、Polybrene を加えて培養した³。4 日後、レイトン管に継代した後、カバーガラスは 3 日後にアセトン固定し、蛍光抗体直接法 (以下 FFA と略す) にて

* 北里大学獣医畜産学部 (青森県十和田市大字三本木字前谷地149-2)

** 北里研究所附属家畜衛生研究所 (千葉県柏市松ヶ崎1139-1)

判定しウイルス力価を決定した。なお、FA は gp 抗原に対する抗体（以下 gp 抗体と略す）と P 抗原に対する抗体（以下 P 抗体と略す）の両方を含有する No. 4571 血清に Kawamura の方法で蛍光色素を結合させて用いた⁷⁾。

3) A G I D 試験用の抗原作出

ウイルス培養液は 7,000 回転, 30分遠心し, ウイルス不活化剤として N-acetythylenimine (以下 A E I と略す) を加え, 37°C, 24hr 反応させた^{5,11)}。A E I 処理材料からの抗原作成方法は ONUMA らに準じ⁹⁾, 培養液 100 ml に硫酸アンモニウムを 30 g の割合に加えて塩析後, 沈殿を P B S に浮遊したものをポリエチレングリコール (#6,000) にて強制透析し, 出発材料の 1/150 量に濃縮し抗原とした。この抗原にはエーテル低抗性のコア-蛋白抗原 (以下 P 抗原と略す) と, エーテル感受性のエンペローブ糖蛋白抗原 (以下 gp 抗原と略す) が主要抗原として含まれる^{8,14)}。P 抗原は ONUMA らの方法に準じ, ウイルス材料を超遠心沈殿後, エーテル処理を行なって作出した¹⁴⁾。参考抗原として MILLER 博士より分与を受けた gp 単独抗原を使用した。

4) 血 清

gp および P 両抗体を含む No. 4571 血清は白血病人から, gp 抗体のみ含む No. 1023 血清は感染未発病人から得た。参考血清として MILLER 博士より分与された gp 抗体のみを含む牛血清と, 小沼博士より分与された両抗体を含む V # 34 羊血清を用いた。

野外牛血清は 1977 年と 1978 年に青森県下で採取した。また, 同県内の一酪農家より, 26頭の搾乳中の乳牛からも血清を採取した。

これら 453 頭にはリンパ肉腫やリンパ球増多症牛の存在は認められなかった。

5) A G I D 試験

AGID 試験は ONUMA ら¹⁴⁾に準じたが, 1% アガロース (A-37, 半井化学) をスライドガラス (76×26mm) に刷毛で下塗りし, 乾燥させた。つぎに 0.8% アガロースの 5 ml で寒天層を作り, ゲルパンチャー (萱垣医理科) にて反応用の穴をあけた。穴は中央の 1 個 (5mm) を周囲の 6 穴 (5mm) が等間隔で取り囲み, 穴の辺縁と辺縁は全て 3mm 間隔とした。穴は必要に応じ 2~7 個を用い, 正確に 0.05 ml の抗原および血清を各々中央および周囲の穴に 1 回のみ入れ, 反応箱にて室温で 72 hr 反応後, 観察箱を用いて判定した。抗原および抗体の単位は, 可視沈降線の出現する最終希釈濃度を各々 1 単位とした。

2. 成 績

1) A E I による B L V の不活化

出発材料のウイルス感染価は約 1,000 TCID₅₀/ml で

ある。これに A E I を最終濃度 0.05, 0.025, 0.01 および 0% に加え, 37°C, 24 hr 不活化した結果, いずれの濃度においても感染価は検出されなかった。A E I の各濃度ごとに 150 倍濃縮抗原を作り力価測定を行なったが, 0~0.05% の濃度においてはすべて gp 抗原 16 単位, P 抗原 32 単位を示し, A E I による力価の低下はみられなかった。また, これらの抗原力価は A E I を加えず, 4°C, 24 hr 放置したものと同力価であり, 37°C 放置による抗原低下がみられないことを示している。以上の結果から, 以後の実験は MILLER らに準じ 0.05% の濃度を用いた¹¹⁾。

2) 抗原および血清の同定

抗原としては, 作出した gp および P 両抗原を含むものと, エーテル処理 P 抗原および MILLER 氏分与の gp 抗原を用い, 血清としては gp および P 両抗体を含む V # 34 および No. 4571, gp 抗体のみを含む MILLER 氏分与血清および No. 1023 血清を用いた。これらの血清と抗原を組合せて AGID を行ない, 作出抗原が BLV 抗原であり gp と P 抗原を含むことを確認し, 同時に

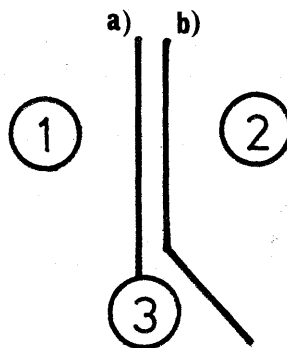


図1 ボックス力価測定法

①: 2 倍階段希釈抗原 ②: 2 倍階段希釈血清 (No. 4571 血清) ③: 4 単位 P 抗原 a) gp 抗原抗体反応による沈降線 b) P 抗原抗体反応による沈降線

No. 4571 が両抗体を, No. 1023 血清が gp 抗体のみを含有することを同定した。

3) 抗原および抗体力価の測定

抗原および抗体の力価は 3 種類のボックス力価測定法によって決定した。

(1) 抗原および抗体を各々 2 倍階段希釈し, 図 1 に示す方法によった。この結果は表 1 に示すごとく, gp および P 抗原力価はそれぞれ 16 および 32 単位であり, No. 4571 血清は gp 抗体 64 倍, P 抗体 64 倍であった。

(2) この方法は 2 個の穴を用い各々 2 倍階段希釈抗原および gp 抗体のみを含む No. 1023 血清を用いた。したがって, この系で出現する沈降線は gp のみであり,

寒天ゲル内免疫拡散法に用いる牛白血病ウイルス抗原の最適力価について

表1 抗原力価の測定—a)

抗原希釈	×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64
	*1	*2					
	P	gp	P	gp	P	gp	P
	gp	P	gp	P	gp	P	gp
血清希釈 (No. 4571 血清)	*3						
	×1	++	++	++	++	++	+ - - -
	×2	++	++	++	++	++	+ - - -
	×4	++	++	++	++	++	+ - - -
	×8	++	++	++	++	++	+ - - -
	×16	++	++	++	++	++	+ - - -
	×32	- +	- +	- +	++	++	+ - - -
	×64	- -	- -	- +	++	++	+ - - -
×128	- -	- -	- -	- -	- -	- - - -	

*1: P 抗原 *2: gp 抗原 *3: +): 陽性反応
-): 陰性反応

この方法ではP抗原力価の測定は不可能である。その結果は gp 抗原 16 単位, gp 抗体 8 単位を示した(表2)。

(3) P 抗原力価の測定は 2 個の穴を用い, 一方に 2 倍階段希釈 P 抗原を, 他方に gp と P の両抗体を含む No. 4571 血清を 2 倍階段希釈して入れた。したがって, この系で出現する沈降線は P のみである。結果は表3に示すごとく, P 抗原 32 単位, P 抗体 64 単位を示した。

以上 3 種の方法で別に作成した 6 ロットの抗原について力価を測定した結果, gp は 16~32 単位を, P は 32~64 単位を示し, 常に P 抗原は gp 抗原の 2 倍を示して一定であり, ロット間の差も 2 倍の範囲内であった。また, いずれの方法でも高力価抗原では低力価抗体の検出が困難であり, 低力価抗原では沈降線が弱く判定困難であった。

表2 抗原力価の測定—b)

抗原希釈	×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64
血清希釈 (No. 1023 血清)	*						
	×1	+	+	+	+	-	-
	×2	+	+	+	+	-	-
	×4	-	-	-	+	+	-
	×8	-	-	-	-	+	-
	×16	-	-	-	-	-	-
	×32	-	-	-	-	-	-

*: +): 陽性反応 -): 陰性反応

表3 抗原力価の測定—c)

P 抗原希釈	×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64
血清希釈 (No. 4571 血清)	*						
	×4	+	+	+	+	+	-
	×8	+	+	+	+	+	-
	×16	-	+	+	+	+	-
	×32	-	-	+	+	+	-
	×64	-	-	-	+	+	-
×128	-	-	-	-	-	-	

*: +): 陽性反応 -): 陰性反応

4) 異なる抗原力価による抗体検出率について

427 頭の放牧牛と 26 頭の乳牛について, 異なる抗原力価を用いて抗体検出率の差を調べた。実験には gp および P 両抗原を含むものを用い, gp 抗原を 2~8 単位に調整した。したがって, P 抗原は gp の 2 倍量含まれるため 4~16 単位を含むことになる。AGID は gp 抗原力価で調整したものを中央に, 周囲 6 穴のうち左右 2 穴に両抗体を含む陽性対照血清 No. 4571 の 8 単位を, 残

表4 異なる抗原力価による抗体検出率について*1

抗原力価	4*2	2*3	8	4	16	8	計*4	
	P	gp	P	gp	P	gp	P	gp
A 地区	{ 6/80*5 7.5%	{ 41/80 51.3%	{ 6/80 7.5%	{ 42/80 52.5%	{ 3/80 3.8%	{ 42/80 52.5%	{ 6/80 7.5%	{ 43/80 53.8%
B 地区	{ 9/101 8.9	{ 50/101 49.5	{ 11/101 10.9	{ 61/101 60.4	{ 6/101 5.9	{ 65/101 64.4	{ 12/101 11.9	{ 65/101 64.4
C 地区	{ 1/47 2.1	{ 28/47 59.6	{ 1/47 2.1	{ 31/47 60.0	{ 1/47 2.1	{ 32/47 68.1	{ 1/47 2.1	{ 32/47 68.1
D 地区	{ 5/98 5.1	{ 45/98 45.9	{ 5/98 5.1	{ 49/98 50.0	{ 2/98 2.0	{ 49/98 50.0	{ 5/98 5.1	{ 50/98 51.0
E 地区	{ 12/101 11.9	{ 52/101 51.5	{ 12/101 11.9	{ 61/101 60.4	{ 9/101 8.9	{ 61/101 60.4	{ 12/101 11.9	{ 61/101 60.4
F 乳牛	{ 4/26 15.4	{ 20/26 76.9	{ 4/26 15.4	{ 22/26 84.6	{ 4/26 15.4	{ 22/26 84.6	{ 4/26 15.4	{ 22/26 84.6
合計	{ 37/453 8.2	{ 236/453 52.1	{ 39/453 8.6	{ 266/453 58.7	{ 25/453 5.5	{ 271/453 59.8	{ 40/453 8.8	{ 273/453 60.3

*1: gp および P 両抗原を含むものを gp 抗原力価で 2, 4, 8 単位に調整した。よって, P 抗原力価は各々 4, 8, 16 単位である。 *2: 4 単位 P 抗原 *3: 2 単位 gp 抗原 *4: gp 抗原 2~8 単位, または P 抗原 4~16 単位のいずれかで陽性を示すもの。 *5: 抗体陽性頭数/検査頭数

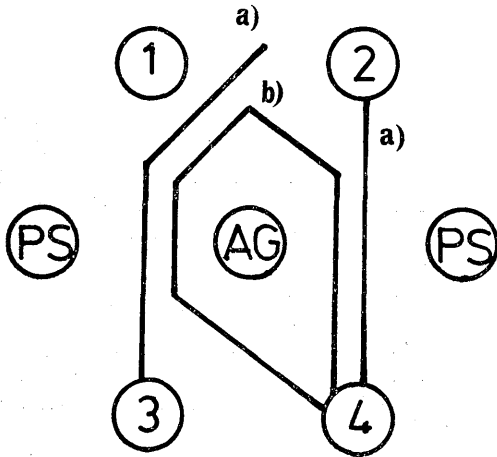


図2 AGID試験による抗体検出

①～④：被検牛原液血清 PS：8単位の gp および P 抗体を含む No. 4571 陽性対照血清 AG：2, 4 および 8 単位の調整した P 抗原を含む gp 抗原
 a) P 抗原抗体反応による沈降線 b) gp 抗原抗体反応による沈降線

り4穴に被検血清を入れた。判定は抗原と被検血清間に出現する2本の沈降線のいずれかと隔合する場合に陽性とした(図2)。結果は表4に示すごとく、gp 抗原2, 4, 8単位における抗体陽性率は各々52.1, 58.7, 59.8%を示し、2, 4, 8単位のいずれかで陽性を示すものは60.3%であった。これらの間では抗体検出率に有意差はみられなかった。P抗体検出率は5.5～8.8%であり、gp抗体陽性率より著しく低かった。この結果においてgp抗原力価が2単位では沈降線が弱く判定困難な例も出現した。また、8単位抗原では抗原が強くと沈降線が血清側に押されて判定困難な例もみられ、4単位抗原が最良であった。

表5 抗体陽性牛における抗体力価の測定

血清希釈	×1	×2	×4	×8	×32
gp 抗原4単位	$\frac{137}{137}$ 100%*	$\frac{89}{109}$ 81.7%	$\frac{59}{137}$ 43.1%	$\frac{15}{137}$ 10.9%	$\frac{0}{137}$ 0%
P 抗原4単位	$\frac{27}{137}$ 19.7%	$\frac{15}{109}$ 13.8%	$\frac{2}{137}$ 1.5%	$\frac{0}{137}$ 0%	$\frac{0}{137}$ 0%

*：抗体陽性頭数/検査頭数

5) 抗体陽性牛における抗体力価の測定

放牧牛427頭のうち抗体陽性牛を無作為に137頭抽出し、gpとPの抗体力価を測定した。エーテル処理抗原およびgp抗原は各々4単位に調整し、図3のごとくにAGIDを行なった。結果は表5に示すごとく、gp抗体陽性牛のうち81.7%が1～2倍を示し、32倍を示すものは0%であった。gp抗体陽性牛のうちP抗体陽性牛は19.7%のみと低く、またgp抗体陰性でP抗体陽性牛は存在しなかった。

3. 考 察

BLV感染牛は多くの国で問題とされ、AGIDを主体とした抗体検出法が行なわれている^{2,12)}。その使用抗原はgpおよびPの両抗原を含有するが、これらの抗原力価について触れた報告はみられない。

感染牛ではP抗体よりもgp抗体が早期に出現する^{9, 10, 12, 14)}。このためgp抗原を用いる検出法が良好である。いっぽう、P抗体保有牛は一般に少数例であるが、このような牛では同時に高力価のgp抗体を保有する例が多いこと、および発症牛にこのような牛が多いこと(未発表)を考えるとgp抗体と同時にP抗体の検出が望ましい。したがって、両抗体を検出するためには両抗原を別々に作出し、各々の最適抗原力価を含有すべく調整する必要がある。われわれの抗原は両抗原を別途に作出した

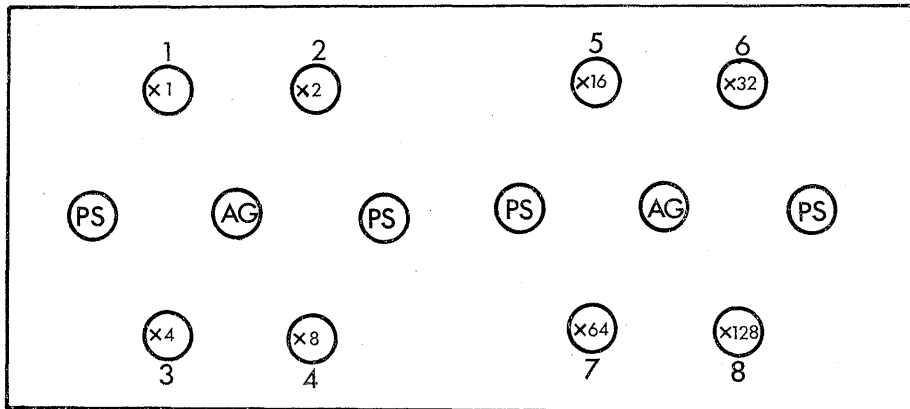


図3 AGIDによる抗体力価の測定法

1～8：被検希釈血清 PS 8単位の gp および P 抗体を含む No. 4571 陽性対照血清 AG 4単位に調整した gp または P 抗原

ものではなく、そのため両抗原を含有するものの各々の抗原力価は異なる。すなわち、gp 抗原力価は最適力価の4単位を含むが、P 抗原は8単位を含み、やや高力価である。われわれの行なったボックス力価測定法では、高力価抗原では低力価抗体の検出が困難であるし、逆に低力価抗原では高力価抗体の検出が困難であった。しかし、gp およびPの両抗体を含有する陽性対照血清を2穴に、他の4穴に被検血清を置く方法(図2)では、抗原および抗体力価の高低が沈降線形成に及ぼす影響は小さくなり判定は容易となった。したがって、作出した4単位のgp および8単位のP 抗原を含有する抗原においても、gp 抗体のみならずP 抗体の検出も可能となった。このことは多少の抗原力価の“ぶれ”は陽性対照血清の存在で解決出来るように思われる。しかし、一定の抗原力価を常に調整するためには、ボックス力価測定法によらず、Single radial immunodiffusion 試験にて決定することが必要となり、今後検討を要する。

文 献

- 1) ABT, D. A., MARSHAK, R. R., FERRER, J. F., et al.: *Vet. Microbiol.*, 1, 287~300 (1976).
- 2) BURNY, A., BEY., CHANTRENNE, H., et al.: *Adv. Cancer Res.*, 28, 251~311 (1978).
- 3) DIGLIO, C. A., PIPER, C. E. and FERRER, J. F.: *In Vitro*, 14, 502~505 (1978).
- 4) FELLOWES, O. N.: *J. Immunol.*, 95, 1100~1106 (1966).
- 5) FERRER, J. F., ABT, D. A., BHATT, D. M., et al.: *Cancer Res.*, 34, 893~900 (1974).
- 6) FERRER, J. F., PIPER, C. E. and BALIGA, V.: *In: Bovine leukosis*, BURNEY, A., ed., 323~336, Comm. Eur. Commun., Luxembourg (1977).
- 7) KAWAMURA, A.: *Fluorescent antibody techniques and their applications*, p. 11~74, University of Tokyo Press and University Park Press (1969).
- 8) MARSHALL, P., MILLER, J. M. and VAN DER MAATEN, M. J.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 60, 213~217 (1978).
- 9) MILLER, J. M. and VAN DER MAATEN, M. J.: *Vet. Microbiol.*, 1, 195~202 (1976).
- 10) MILLER, J. M., VAN DER MAATEN, M. J. and PHILLIPS, M.: *In: Bovine leukosis*, BURNEY, A., ed., 69~82, Comm. Eur. Commun., Luxembourg (1977).
- 11) MILLER, J. M. and VAN DER MAATEN, M. J.: *Ann. Rech. Vet.*, 9, 871~877 (1978).
- 12) MUSSGAY, M. and KAADEN, O.: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 79, 43~72 (1978).
- 13) OLSON, C., MILLER, L. D., MILLER, J. M., et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 49, 1463~1466 (1972).
- 14) ONUMA, M., OLSON, C., BAUMGARTENER, L. E., et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 1155~1158 (1975).
- 15) VAN DER MAATEN, M. J. and MILLER, J. M.: *Bibl. Haematol.*, 43, 377~379 (1976).
- 16) VAN DER MAATEN, M. J. and MILLER, J. M.: *Bibl. Haematol.*, 43, 360~362 (1976).